

STREPTOCOCCUS AGALACTIAE (GBS) PNA FISH -TEKNIIKAN SOVELTUMINEN B-RYHMÄN STREPTOKOKIN TUNNISTUKSEEN

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto
Bioanalytiikan koulutusohjelma		
Tekijä/Tekijät		
Sofia Polichronidis		
Työn nimi		
Streptococcus agalactiae (GBS) PNA FISH -tekniikan soveltuminen B-ryhmän streptokokin tunnistukseen		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö	Kevät 2007	15 + 8 liitettä
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki (GBS = Group B Streptococcus, Streptococcus agalactiae) aiheuttaa vakavia infektioita yleensä vastasyntyneillä. Tartunta saadaan yleensä synnytyskanavasta ja riskitekijöinä ovat muun muassa keskosuus, ennenaikainen lapsivedenmeno ja äidin runsas B-streptokokkikolonisaatio emättimessä. Bakteerin tunnistukseen käytetään tällä hetkellä viljelytekniikkaa, jonka tulos saadaan vasta 24-48 tunnin kuluttua.</p> <p>Opinnäytetyöni tarkoituksena on tutkia uutta ja nopeampaa tunnistusmenetelmää: GBS PNA FISH -tekniikkaa (Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization). Tarkoituksena on tutkia tekniikan spesifiteettiä ja sensitiviteettiä. Tekniikan spesifiteettiä tutkitaan B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla sekä kuudella muulla emättimen normaaliflooraan kuuluvalla bakteerilajilla. Yhteensä bakteerikantoja on tutkimuksessa mukana 48 kappaletta. Tämän lisäksi tutkitaan myös tekniikan sensitiviteettiä, jota tutkitaan bakteereista tehdyn laimennossarjan avulla. Sensitiviteettiä tutkitaan bakteeriseoksesta, jonne on B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin lisäksi lisätty muita emättimen normaaliflooran bakteereita. Lisäksi sensitiviteettiä tutkitaan pelkällä B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla käyttäen sekä normaalia että bakteerin rikastusmenetelmää. Testeistä saadut tulokset tulkitaan fluoresenssimikroskoopin avulla.</p> <p>GBS PNA FISH -tekniikan spesifiteettiä todettiin erittäin hyväksi. Tekniikka tunnisti kaikki B-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit positiivisiksi ja kaikki muut lajit antoivat negatiivisen tuloksen. B-streptokokin positiivisuus oli erotettavissa mikroskopoitaessa vahvana fluoresointina, kun taas muut lajit eivät fluoresoineet lainkaan. GBS PNA FISH -tekniikan sensitivisyyden tulokset eivät kuitenkaan täyttäneet odotuksia. Ainoastaan bakteerin rikastusmenetelmällä saadut tulokset olivat loistavia, mutta bakteeriseoksella ja pelkällä B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla saadut tulokset olivat lähes olemattomia. Rikastusmenetelmän kaikki laimennokset fluoresoivat positiivisina, kun taas muissa tapauksissa vain vahvin liuos antoi jonkinlaista positiivista fluoresointia.</p> <p>GBS PNA FISH -tekniikan spesifiteettiä todettiin hyväksi. Tekniikan sensitiviteettiä ei kuitenkaan vastaa käyttötarkoitusta ja todellisessa tilanteessa tekniikka ei pystyisi tunnistamaan sille spesifistä bakteeria muiden bakteerien joukosta.</p>		
Avainsanat		
Streptococcus agalactiae, B-ryhmän streptokokki, GBS PNA FISH		



Degree Programme in Biomedical Laboratory Science		Degree Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors Sofia Polichronidis			
Title Experiment of <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS) PNA FISH -Technique for Identification of Group B <i>Streptococcus</i>			
Type of Work Final Project	Date Spring 2007	Pages 15 + 8 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>Group B <i>Streptococcus</i> (GBS, <i>Streptococcus agalactiae</i>) is causing serious infections usually in newborns. They get infection usually from a mother's vagina and the risk is bigger if the baby is born prematurely or if the water breaks too early or if the mother has a lot of GBS in her vagina. Normally the identification of GBS takes 24-48 hours.</p> <p>The aim of my final project was to examine a new and more faster identification technique: <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS) PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization). The purpose was to examine the specificity and sensitivity of the technique. The specificity was examined with GBS and also with six other bacteria, which commonly reside in the vagina. Together there were 48 bacteria, which were researched. The sensitivity was examined with a dilution consisting of different bacteria. It was also examined only with GBS, normally and also using a growing method. The results were researched using a fluorescence microscope.</p> <p>The specificity of GBS PNA FISH –technique was really good. The technique could identify every GBS bacterium as a positive result and all the other species were negative. The sensitivity was not good. Only by using the growing method I got very good results but with other cases the results were really unsatisfactory.</p> <p>The specificity of GBS PNA FISH was good. The sensitivity was not exact enough and in a real situation this new technique could not identify the GBS bacterium from among a group of other bacteria.</p>			
<p>Keywords</p> <p><i>Streptococcus agalactiae</i>, Group B <i>Streptococcus</i>, GBS PNA FISH</p>			

1 JOHDANTO

B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki aiheuttaa vakavia infektioita yleensä vastasyntyneillä. Tartunta saadaan yleensä synnytyskanavasta ja riskitekijöinä ovat muun muassa keskosuus, ennenaikainen lapsivedenmeno ja äidin runsas B-streptokokkikolonisaatio emättimessä. Sairaaloissa seulotaan yleensä juuri näitä riskiryhmiä ja joissakin sairaaloissa tutkimus tehdään kaikille synnyttäjille, mutta yhteisiä pelisääntöjä ei sairaaloiden välillä ole kuitenkaan vielä olemassa. Synnyttäjille, joiden riski tartuttaa infektio vastasyntyneeseen on suurentunut, annetaan mikrobilääkeprofylaksi synnytyksen yhteydessä. (Huovinen ym. 2003: 118.)

Yleisesti käytössä oleva B-streptokokin tunnistustapa on viljely, joka kestää 24-48 tuntia. Useimmiten on kuitenkin tarpeen saada tieto nopeammin, jos kyseessä on esimerkiksi ennenaikainen lapsivedenmeno ja äidiltä ei ole seulottu aiemmin B-streptokokkia. Tällöin mikrobilääkeprofylaksi annetaan automaattisesti, mutta jos B-streptokokin kolonisaatio saataisiin varmistettua negatiiviseksi nopeammin, äidille ei tarvitsisi antaa mikrobilääkeprofylaksia ja näin äiti säästyisi ylimääräiseltä antibioottiannokselta. Tällä hetkellä B-streptokokkikannat ovat vielä herkkiä useimmille antibiooteille, mutta kuinka kauan kestää, että ne tulevat resistenteiksi niille?

Viljelyn rinnalle on kehitelty useita erilaisia B-streptokokin tunnistuskeinoja, joilla voitaisiin nopeuttaa bakteerin tunnistusta. Yksi uusimmista tekniikoista on *Streptococcus agalactiae* (GBS) PNA FISH -tekniikka, jonka toimivuutta opinnäytetyössäni on tarkoitus kokeilla. Tällä uudella tekniikalla B-streptokokkitulos saataisiin jo 2-3 tunnin kuluttua eli huomattavasti nopeammin kuin nykyisin käytössä olevalla viljelyllä.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on tutkia GBS PNA FISH -tekniikan spesifiteettiä ja sensitiviteettiä. Spesifiteettiä tutkitaan jo tunnistetuilla B-streptokokkikannoilla ja tarkoituksena on saada selville kuinka paljon vääriä negatiivisia tuloksia tekniikka antaa. Lisäksi spesifiteettiä tutkitaan myös muilla emättimen normaaliflooraan kuuluvilla bakteerilajeilla ja tällä tavoin varmistetaan, että tekniikka ei anna vääriä positiivisia tuloksia muista bakteerilajeista. Spesifiteetin lisäksi tutkitaan myös sensitiviteettiä, jota tutkitaan laimennossarjan avulla. Näin saadaan selville kuinka herkästi B-streptokokki saadaan tunnistettua.

Tämä opinnäytetyö on tehty HUSLABin kliinisen mikrobiologian laboratorioon, bakteriologian osastolle. Opinnäytetyötäni HUSLABissa ohjaa dosentti Pentti Kuusela.

2 B-RYHMÄN BEETAHEMOLYYTTINEN STREPTOKOKKI

B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki (GBS = Group B Streptococcus) eli *Streptococcus agalactiae* on gram-positiivisesti värjäytyvä bakteeri, joka kuuluu emättimen ja alemman suoliston normaaliflooraan. Ryhmäspesifisen seinäpolysakkaridin ulkopuolella *Streptococcus agalactiae*lla on polysakkaridikapseli, joka on erityisen tärkeä sen taudinaiheuttamiskyvylle. Polysakkaridikapselin perusteella kannat jaetaan seitsemään eri antigeenityyppiin, joista Ia, Ib, II ja III ovat ihmisillä yleisimmät. (Huovinen ym. 2003: 118.)

Streptococcus agalactiae on yksi tärkeimmistä vastasyntyneiden bakteremian ja meningiitin aiheuttajista. Vastasyntyneiden infektiot luokitellaan varhaisiin (< 7 vuorokauden iässä alkaviin) ja myöhäisiin (≥ 7 vuorokauden iässä). Vaikea yleisinfektio (sepsis), aivokalvotulehdus tai keuhkokuume ovat tavallisimpia tautimuotoja. (Carlson ym. 2002: 4913.)

Streptococcus agalactiae on herkkä muun muassa penisilliineille ja kefalosporiineille. Antibioottihoitona käytetään ensisijaisesti penisilliiniä. Erytromysiiniherkkyys vaihtelee 0-10 % ja resistentit kannat ovat usein resistenttejä myös klindamysiinille. (Huovinen ym. 2003: 119.)

3 GBS-INFEKTIO

B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki (GBS = Group B Streptococcus, *Streptococcus agalactiae*) on vastasyntyneiden yleisin bakteremian ja meningiitin aiheuttaja. Infektiot luokitellaan varhaisiin (< 7 vrk iässä) ja myöhäisiin (≥ 7-89 vrk iässä). Varhaisista infektioista 90 % ilmaantuu ensimmäisen vuorokauden aikana. GBS-infektion saaneista vastasyntyneistä 4 % kuolee; vaara on suurin etenkin ennenaikaisesti syntyneillä. (Carlson ym. 2006: 4821.)

GBS-tartunnan todennäköisin lähde on synnyttäjän maha-suolikanava, josta bakteeri voi levitä virtsa- ja sukuelimiin. Raskaana olevista naisista 10-30 % on GBS:n oireettomia kantajia eli heillä GBS on kolonisoitunut suolikanavaan tai emättimeen. Puolet kaikista GBS-kantajanaisten synnyttämistä lapsista kolonisoituu, mutta vain 1-2 % näistä saa varhaisen invasiivisen GBS-infektion. Muita tilanteita, joissa vastasyntyneen GBS-riski on suurentunut ovat ennenaikaisuus (< 37 raskausviikkoa), äidin kuume synnytyksen aikana ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) ja pitkittynyt aikaväli kalvojen puhkeamisesta synnytykseen (≥ 18 tuntia). Noin 25 % vastasyntyneiden invasiivisista GBS-infektioista esiintyy ennenaikaisesti syntyneillä. GBS-riskiä lisää myös äidin runsas GBS-kolonisaatio tai äidin aiemmalla lapsella todettu vastasyntyneen invasiivinen GBS-infektio. GBS-bakteriuria on yleensä merkki runsaasta kolonisaatiosta. Myös GBS-kantajanaisten riski sairastua vakaviin infektioihin (endometriitti, amnioniitti, bakteremia) on lisääntynyt. (Carlson ym. 2002: 4913; Carlson ym. 2006: 4822.)

Useimmiten varhaisissa GBS-infektioissa tartunta tapahtuu äidin synnytyskanavasta synnytyksen yhteydessä; myöhäisten GBS-infektioiden tartuntamekanismi on yhä epäselvä. Suurin osa varhaisista infektioista voidaan ehkäistä antamalla mikrobilääkeprofylaksi sellaisille synnyttäjille, joiden riski tartuttaa infektio vastasyntyneeseen on suurentunut. Suomessa käytössä olevat GBS-ehkäisyohjeet kuitenkin vaihtelevat sairaaloiden välillä ja yhtenäisiä käytäntötapoja ei ole. Osassa sairaaloista seulotaan vain riskiryhmiä ja joitain ryhmiä seulotaan myös tarpeettomasti. Lisäksi GBS-viljelyn näytteenottokohdat ja -menetelmät eivät aina ole tutkimusnäyttöön perustuvia. Kaikki riskiryhmiin kuuluvat synnyttäjät eivät myöskään ole aina saaneet synnytyksenaikaista mikrobilääkeprofylaksia, jolla ehkäistään suurin osa varhaisista GBS-infektioista. (Carlson ym. 2006: 4821-4822.)

Suomalainen tutkimusryhmä, Carlson ym. 2006, on nyt kuitenkin tehnyt suosituksen, jonka tavoitteena on parantaa ja yhtenäistää sairaaloiden GBS-ehkäisyohjeita. Suositus on tehty yhdessä sairaalainfektio-ohjelmaan (SIRO) osallistuvien sairaaloiden asiantuntijoiden kanssa. Suositus koskee vain synnytyksen aikana annettavaa GBS-mikrobilääkeprofylaksia. Suositus on tarkoitettu erityisesti obstetrikkojen ja neonatologien käyttöön ja se sisältää myös ohjeet tarvittavista mikrobiologisista menetelmistä GBS-kantajaäitien tunnistamiseksi.

4 PNA FISH TEKNIikka

PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization) on in situ hybridisaatioon perustuva tunnistusmenetelmä, joka käyttää tunnistuksessa fluoresenssia apunaan. Fluoresoiva PNA koetin on täysin keinotekoisesti tehty koetin ja se tarttuu bakteerin ribosomaaliseen RNA:han (rRNA). PNA koettimen sähköinen varaus on neutraali ja se kiinnittyy spesifisemmin kohteeseensa. Bakteerien rRNA tunnetaan myös paremmin kuin DNA, joten koetin saadaan myös tällä tavoin spesifisemmäksi. (Coull ym. 2002; Oriola 2005.)

PNA-molekyylit (Peptide Nucleic Acid) ovat DNA-molekyylien kaltaisia ketjuja, joissa DNA:n negatiivisesti varautunut sokerifosfaattiosa on korvattu neutraalilla polyamidiosalla. PNA -koettimen synteettinen ”selkäranka” mahdollistaa sille yksilölliset hybridisaatio-ominaisuudet, joita ovat muun muassa koettimen nopea ja vahva kiinnittyminen sen emäksiä vastaaviin kohteisiin. PNA -koettimen synteettisyys takaa sille myös korkean stabiilisuuden, jonka johdosta se pystyy säilyttämään ominaisuutensa myös erilaisissa entsymiseoksissa, jotka normaalisti haittaisivat esimerkiksi DNA -koettimien toimintaa. (Coull ym. 2002: 2.)

PNA -koettimet ovat myös lyhyempiä (yleensä noin 15 emästä) kuin DNA -koettimet, jolloin PNA -koettimen kiinnittymistarkkuus on tarkempi kuin DNA -koettimen. PNA -koetin pystyy myös erottamaan yhdenkin emäksen erilaisuuden tarkemmin kuin DNA -koetin, joten sen kiinnittymisessä tapahtuu vähemmän virheitä ja se osaa tarttua varmasti oikeaan kohteeseen. (Coull ym. 2002: 2.)

Tässä työssä käytettävä koetin on tehty nimenomaan B-ryhmän beetahemolyttiselle streptokokille, jolloin sen tulisi tarttua vain B-ryhmän streptokokin ribosomaaliseen RNA:han ja siellä siis koettimessa olevia emäksiä vastaaviin emäksiin. Koetinhän on tehty niin, että siinä oleva emäsjärjestys on tyypillinen juuri kyseessä olevan bakteerin rRNA:lle ja sitä esiintyy usein toistuvina jaksoina tutkittavassa bakteerissa, joka siis tässä tapauksessa on B-ryhmän beetahemolyttinen streptokokki. (Oriola 2005.)

Streptococcus agalactiae (GBS) PNA FISH –tekniikassa bakteeri kiinnitetään aluksi objektilasille, jonka jälkeen objektilasille lisätään fluoresoiva PNA -koetin. Objektilasia inkuboidaan, jolloin fluoresoiva PNA –koetin hybridisoituu ribosomaaliseen RNA:han (rRNA). Tämän jälkeen ylimääräinen koetin poistetaan objektilasilta pesuliuksella. Näiden vaiheiden jälkeen objektilasi on valmis mikroskoipoitavaksi. (Coull ym. 2001; Oriola 2005.)

5 TUTKIMUSONGELMAT

GBS PNA FISH –tekniikka on suunniteltu B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin tunnistukseen. GBS PNA FISH –tekniikan tulokset perustuvat näytteen fluoresointiin. Positiivinen tulos näkyy siis fluoresointina mikroskopoitaessa näytelasia. Negatiivinen näytelasi ei fluoresoi mikroskopoitaessa.

Ensimmäinen selvittävä tutkimusongelma on GBS PNA FISH –tekniikan spesifiteetti. Tutkimukseen käytetään kvalitatiivista tutkimusmenetelmää. Spesifiteetillä tarkoitetaan tarkkuutta, jolla tekniikka tunnistaa eri bakteerilajit. GBS PNA FISH –tekniikan tulisi tunnistaa positiivisiksi ainoastaan B-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit ja muiden bakteerilajien tulos tulisi olla negatiivinen. GBS PNA FISH –tekniikan tulisi myös tunnistaa kaikki B-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit, joten vääriä negatiivisia vastauksia testi ei saisi antaa. Ensimmäinen tutkimuskysymys kuuluukin: miten tehokkaasti GBS PNA FISH –tekniikka tunnistaa B-ryhmän beetahemolyyttiset streptokokit verrattuna muihin bakteerilajeihin?

Toisena tutkimusongelmana on GBS PNA FISH –tekniikan sensitiviteetti. Tutkimukseen käytetään kvantitatiivista tutkimusmenetelmää. Sensitiviteetillä tarkoitetaan herkkyyttä eli pyritään löytämään pienin mahdollinen bakteerimäärä, jonka tekniikka pystyy osoittamaan positiiviseksi. Tässä tapauksessa pyritään löytämään B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin pienin mahdollinen bakteerimäärä, jonka fluoresoinnin pystyy erottamaan positiiviseksi näytelasilta. Tekniikan spesifiteettiä tutkittaessa kaikki bakteerilajit käsitellään eri näytelaseilla. Sensitiviteettiä tutkittaessa näytteeksi sekoitetaan bakteeriseos, joka mahdollisimman hyvin vastaisi emättimen normaaliflooraa ja siihen kuuluvia bakteereita. Bakteeriseoksesta tehdään sen jälkeen useita laimennoksia ja jokaisesta laimennoksesta tehdään GBS PNA FISH –testi. Laimennoksista tehdään myös hajotusviljelmät bakteerimaljoille ja maljojen kasvusta lasketaan eri bakteerien pesäkkeet, jolloin saadaan eri bakteerien CFU-määrä (Colony Forming Unit), joka kertoo arvion liuoksessa olevasta bakteerimäärästä. CFU-määrän avulla voidaan laskea arvioitu määrä siitä kuinka paljon alkuperäinen kantaliuos on sisältänyt eri bakteerilajeja. Tämän jälkeen saadaan helposti myös laskettua jokaisen laimennoksen sisältävä bakteerimäärä ja erityisesti B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin määrä. Toinen tutkimuskysymys kuuluukin: kuinka paljon B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia tulee löytyä näytteestä, jotta GBS PNA FISH –tekniikka pystyy sen erottamaan muiden bakteerien joukosta? Kuinka herkkä GBS PNA FISH –testi siis todellisessa tilanteessa on?

Kolmantena tutkimusongelmana on GBS PNA FISH –tekniikan sensitiviteetin tutkiminen rikastusmenetelmällä. Kolmas tutkimusongelma syntyi GBS PNA FISH –tekniikan sensitiviteetin osoittautuessa melko huonoksi. Tutkimukseen käytetään kvantitatiivista tutkimusmenetelmää. Sensitiviteettiä tutkittaessa rikastusmenetelmällä kantaliuokseksi sekoitetaan jälleen bakteeriseos. Tällä kertaa seokseen lisätään vain B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia. Seoksesta tehdään sen jälkeen useita laimennoksia, jotka rikastetaan ja jokaisesta laimennoksesta tehdään GBS PNA FISH –testi. Laimennoksista tehdään myös hajotusviljelmät bakteerimaljoille ja maljojen kasvusta lasketaan bakteeripesäkkeet, jolloin saadaan bakteerin CFU-määrä (Colony Forming Unit). CFU-määrän avulla voidaan laskea arvioitu määrä siitä kuinka paljon alkuperäinen kantaliuos on sisältänyt B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia. Tämän jälkeen saadaan laskettua jokaisen laimennoksen B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin määrä. Kolmas tutkimuskysymys kuuluu: kuinka paljon B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia tulee löytyä näytteestä, jotta GBS PNA FISH –tekniikka pystyy sen erottamaan?

Aikaisempia tutkimuksia kyseisestä aiheesta ei ole tehty. GBS PNA FISH –testipaketin valmistaja AdvanDx, Marc Fiandacan johdolla, tekee kuitenkin parhaillaan samantyyppistä tutkimusta Yhdysvalloissa, mutta tuloksia ei kuitenkaan ole vielä julkisesti raportoitu. Ohjaajani Pentti Kuusela HUSLABista on kuitenkin saanut suullisen tiedonannon tutkimusryhmältä ja heidän tuloksensa ovat olleet samantyyppisiä kuin tässä tutkimuksessa saadut tulokset. (Kuusela 2007.)

6 MENETELMÄOHJE

GBS PNA FISH -testin suorittamiseen käytetään AdvanDx:in testipakettia ja Oriolan tekemää työohjetta. (Ks. liite 1.)

6.1 Välineet

Valmistaja AdvanDx:in GBS PNA FISH testipakkaukseen kuuluu kiinnitysseos (AdvanDx Fixation Solution), koetinliuos (AdvanDx GBS PNA), pesuliuos (AdvanDx 60x Wash Solution) sekä loppukiinnitysseos (AdvanDx Mounting Medium). Lisäksi tarvitaan tarkoitukseen sopivia objektilaseja, peitinlaseja sekä värjäysastia. Objektilasin tarkasteluun tarvitaan FITC / Texas Red Dual Band -suotimella varustettu fluoresenssimikroskooppi sekä immersioöljyä. (Oriola 2005.)

6.2 Työohje

Maljoilla kasvatetuista bakteereista siirretään 2-3 bakteeripesäkettä tarkoitukseen sopivalle objektilasille. Siirroksen päälle pudotetaan yksi tippa kiinnitysliuosta, joka vahvistaa bakteerin kiinnittymistä objektilasille. Objektilasia lämmitetään lämpölevyllä 20 minuuttia +55-80 °C:ssa. Tämän jälkeen lasi laitetaan etanoliin vähintään viideksi minuutiksi. Etanoli vakauttaa kiinnityksen ja tekee siitä pysyvän. (Oriola 2005.)

Seuraavaksi tapahtuu hybridisointi, jolloin lisätään yksi tippa liuosta (AdvanDx GBS PNA), jossa on mukana GBS PNA FISH koetin, joka on leimattu fluoresoivalla väriaineella. Tämän jälkeen näytteen päälle lisätään peitinlasi liuoksen haihtumisen estämiseksi. Objektilasia inkuboidaan kannellisella lämpölevyllä +55 °C:ssa 90 minuuttia (± 5 minuuttia). Inkuboinnin aikana tapahtuu hybridisaatio, jolloin koettimessa olevat spesifit GBS PNA –molekyyliketjut tarttuvat B-ryhmän beetahemolyyttisen bakteerin ribosomaalisen RNA:n (rRNA) vastaaviin emäksiin. Inkuboinnin aikana valmistetaan pesuliuos (AdvanDx Wash Solution), joka kaadetaan kannelliseen värjäysastiaan ja aloitetaan liuoksen esilämmitys kuumavesihauteessa. (Oriola 2005.)

Viimeisenä vaiheena ennen objektilasin tarkastelua on näytteen pesu ja kiinnitys, jonka aikana poistetaan myös ylimääräinen koetinliuos. Objektilasit upotetaan ilman peitinlasia kuumavesihauteessa olevaan pesuliuokseen 30 minuutiksi (± 5 minuuttia). Pesuliuoksen tulee olla +55 °C:sta. Pesun jälkeen näyte ilmakeivataan ja kiinnitetään AdvanDx Mounting Mediumilla, jota lisätään yksi tippa objektilasille. Objektilasille lisätään vielä peitinlasi, jonka jälkeen se on valmis mikroskopoitavaksi. (Oriola 2005.)

6.3 Mikroskopointi

Objektilasi tarkastellaan fluoresenssimikroskoopin avulla käyttäen FITC / Texas Red Dual Band -suodinta. Koko lasi katsotaan järjestelmällisesti läpi UV-valon avulla ja näytteen fluoresointi merkitsee positiivista näytettä. AdvanDx GBS PNA -koetin on tällöin tarttunut bakteerin rRNA:han ja näyte fluoresoi merkinä siitä. (Oriola 2005.)

Valmiit näytteet tulee säilyttää pimeässä, sillä UV-valo heikentää fluoresoinnin näkymistä ja ajan mittaan kadottaa sen kokonaan. Myös mikroskopoinnin aikana tämä on hyvä muistaa ja pitää UV-valoa päällä vain silloin, kun tarkastelee laseja. Mahdolliset valokuvat näytteestä kannattaa ottaa heti, kun jotain mielenkiintoista sattuu eteen, sillä sen lisäksi että tiettyjä kohtia on merkkeamattomina melkein mahdotonta löytää uudestaan, niiden fluoresoinnin taso heikkenee UV-valon vaikutuksesta.

7 TYÖN SUORITUS

7.1 Bakterikannat

Spesifiteetin tutkimiseen käytettävät bakteerilajit on valittu yleisimmistä emättimen normaaliflooraan kuuluvista bakteereista. Mukaan on valittu B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin eli *Streptococcus agalactiae*n (8 bakterikantaa) lisäksi 6 bakteerilajia: A-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus pyogenes* (8 bakterikantaa), G-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus canis* (8 bakterikantaa), *Enterococcus faecium* (8 bakterikantaa), *Enterococcus faecalis* (8 bakterikantaa), *Lactobacillus sp.* (4 bakterikantaa) sekä *Escherichia coli* (4 bakterikantaa). Bakterikantoja on siis yhteensä 48 kappaletta.

Bakteerilajit ovat vanhoja pakastettuja lajeja, joille on löydettyäessä tehty tarkka lajimääritys. Lajit viljellään uudestaan verimaljoille. Verimalja on yleismalja, jolla kaikki mukana olevat lajit kasvavat ja lisäksi streptokokkien kasvu on mahdollista erottaa verimaljalta niiden aiheuttaman hemolyysin perusteella. Maljoja kasvatetaan lämpökaapissa +35 °C:ssa yhden vuorokauden ajan. *Lactobacillus sp.:n* kasvua avustetaan kasvattamalla se anaerobisessa ympäristössä. Maljoilta poimitaan bakteerilajien pesäkkeitä objektilaseille spesifiteetin tutkimista varten. Lisäksi usean bakteerin seoksella tutkitaan GBS PNA FISH –tekniikan sensitiivisyyttä laimennossarjan avulla. Sensitiivisyys tutkitaan myös pelkällä B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla rikastusmenetelmää käyttäen.

7.2 Spesifiteetti

Spesifiteetillä tarkoitetaan tarkkuutta, jolla tekniikka tunnistaa eri bakteerilajit. Jokaisesta bakteerilajista otetaan useita eri bakterikantoja, joista jokaisesta tehdään näytelasi, joka tutkitaan GBS PNA FISH –tekniikalla. Yhteensä tutkittavia laseja tulee siis 48 kappaletta. Tavoitteena olisi saada kaikista B-ryhmän beetahemolyyttisistä streptokokkikannoista positiivinen tulos ja muista bakterikannoista negatiivinen tulos. Näin saadaan tietää riittääkö tekniikan tarkkuus tunnistamaan pelkät B-ryhmän beetahemolyttiset streptokokit, joiden tunnistukseen tekniikka on suunnattu. (Ks. liite 2.)

GBS PNA FISH –tekniikan tarkkuutta varten jokainen bakteerikanta viljellään omalle verimaljalleen. Maljoja kasvatetaan lämpökaapissa yhden vuorokauden ajan. Verimaljoilta siirretään 2-3 bakteeripesäkettä objektilaseille spesifiteetin tutkimista varten. Testin suorituksen jälkeen objektilasit mikroskopoidaan ja todetaan joko positiiviseksi tai negatiiviseksi.

7.3 Sensitiviteetti

Sensitiviteetillä tarkoitetaan herkkyyttä ja tässä tapauksessa pyritään löytämään B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin pienin mahdollinen bakteerimäärä, jonka GBS PNA FISH –tekniikka pystyy osoittamaan positiiviseksi. Sensitiviteettiä tutkittaessa näytteeksi sekoitetaan bakteeriseos, joka mahdollisimman hyvin vastaisi emättimen normaaliflooraa ja siihen kuuluvia bakteereita. Sensitiviteetti tutkitaan myös yksin B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla.

GBS PNA FISH –tekniikan herkkyyttä varten tehdään siis kaksi bakteeriseosta, joista molemmista tehdään laimennossarjat. Toinen seos on taustaseos ja se sisältää siis muut emättimen normaaliflooraan kuuluvat bakteerit, mutta ei B-ryhmän streptokokkia, koska siitä tehdään oma seoksensa. Taustaseokseen tulevat bakteerilajit ovat *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ja *Lactobacillus sp.* Näitä kahta seosta sekoitetaan yhteen ja niiden yhteisseoksesta tehdään GBS PNA FISH –testi. (Ks. liite 4.)

B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin oma herkkyys tutkitaan myös. Tällöin GBS PNA FISH tehdään vain B-streptokokkilaimennoksista. Tutkittaessa pelkkää B-streptokokkia pyritään herkkyyttä lisäämään sentrifugoimalla laimennoksien solut putken pohjalle, jotta testiin saadaan maksimimäärä laimennoksen sisältämiä soluja. (Ks. liite 5.)

Molemmissa tutkimuksissa laimennoksista lasketaan myös niiden bakteerimäärä. Laimennoksista viljellään hajotukset verimaljoille ja maljojen pesäkkeet lasketaan. Näin saadaan laskettua CFU-määrä (Colony Forming Unit), joka kertoo arvion liuoksessa olevasta bakteerimäärästä.

Sensitiviteettiä tutkittaessa bakteeriseoksesta kävi ilmi, että tekniikka ei olekaan niin herkkä kuin sen pitäisi olla. Tästä johtuen halutaan varmistaa GBS PNA FISH –tekniikan kiinnitysmenetelmän vaikutus asiaan. B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin kiinnitystä objektilasille kokeillaan kolmella eri tekniikalla: perinteisellä ilmaukuvaus ja liekitys –tekniikalla, kiinnitys +55 °C:een lämpölevyllä sekä kiinnitys +80 °C:een lämpölevyllä. Kiinnityksen jälkeen GBS PNA FISH –testi suoritetaan objektilaseille normaalisti, jonka jälkeen eri kiinnitystapojen tuloksia vertaillaan fluoresenssimikroskoopilla. (Ks. liite 6.)

7.4 Sensitiviteetti rikastusmenetelmällä

GBS PNA FISH –tekniikan sensitiivisyyttä tutkitaan myös rikastusmenetelmällä. Rikastuksella pyritään lisäämään tekniikan herkkyyttä tunnistaa B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki. Tutkimuksessa käytetään vain B-streptokokkia sisältävää kantaliuosta, josta tehdään jälleen laimennossarja. Laimennokset sentrifugoidaan jälleen, jonka jälkeen pohjalla oleva bakteerisakka siirretään streptokokkeja suosivaan elatusaineputkeen (Todd-Hewitt). Bakteeriseosta rikastetaan lämpökaapissa neljän tunnin ajan, jonka jälkeen rikastetuista laimennoksista tehdään taas normaalisti GBS PNA FISH –testi. (Ks. liite 7.)

8 TULOKSET

8.1 Spesifiteetti

GBS PNA FISH –tekniikan tarkkuutta tutkittiin yhteensä seitsemällä eri bakteerilajilla, joista yksi oli tietysti B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki eli *Streptococcus agalactiae*. Bakteerilajeista mukana oli useita eri kantoja ja yhteensä GBS PNA FISH –testilaseja tehtiin 48 kappaletta, joista 8 testilasia sisälsi B-streptokokkia. (Ks. liite 2.)

GBS PNA FISH –testin spesifiteetti todettiin erittäin hyväksi. Tekniikka tunnisti kaikki B-streptokokit positiivisiksi ja kaikki muut lajit antoivat negatiivisen tuloksen. Vääriä negatiivisia tuloksia ei myöskään tullut. B-streptokokin positiivisuus oli erotettavissa vahvana fluoresointina objektilasia mikroskopoitaessa. Muut bakteerilajit eivät fluoresoineet, mutta objektilasin taustalla näkyi silti jonkinlainen, hyvin heikosti fluoresoiva, ”utu”. B-streptokokin fluoresointi loisti lasilta kuitenkin selkeästi positiivisena kaikissa tapauksissa. (Ks. liite 3.)

Objektilasit mikroskoipoitiin sekä valomikroskoopilla, jolloin varmistuttiin siitä, että bakteeria ylipäättänsä oli lasilla. Tämän jälkeen objektilasit mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla, jolloin saatiin joko negatiivinen tai positiivinen vastaus näytteen fluoresoinnista.

8.2 Sensitiviteetti

GBS PNA FISH –tekniikan sensitiivisyyden eli herkkyyden tulokset eivät täyttäneet odotuksia. Aluksi sensitiviteettiä tutkittiin bakteeriseoksella, jolla pyrittiin jäljittelemään emättimen normaaliflooraa. GBS PNA FISH –tekniikka osoittautui kuitenkin erittäin epäherkäksi tässä suhteessa, sillä vain vahvimmassa laimennoksessa oli havaittavissa jonkinlaista fluoresointia. (Ks. liite 4.)

Tämän epäonnistumisen jälkeen GBS PNA FISH –tekniikan sensitiivisyyttä kokeiltiin pelkällä B-ryhmän beetahemolyyttisellä streptokokilla. Tulokset olivat hiukan paremmat kuin bakteeriseoksella kokeiltaessa, mutta silti vain kaksi vahvinta laimennosta antoi jonkinlaisen positiivisen tuloksen. (Ks. liite 5.)

Epäonnistumisten jälkeen kokeiltiin eri fiksaatio- eli kiinnitystapoja ja niiden mahdollista vaikutusta lopulliseen tulokseen. Bakteerit kiinnitettiin objektilasille kolmella eri tekniikalla ja parhain tulos saatiin tekniikalla, jossa käytettiin korkeinta lämpötilaa (+80 °C). Tässä lämpötilassa bakteerit olivat tarttuneet objektilasiin erittäin hyvin ja ne näkyivät kaikki samalla tasolla objektilasia mikroskoipoitaessa. (Ks. liite 6.)

8.3 Sensitiviteetti rikastusmenetelmällä

GBS PNA FISH –tekniikan sensitiivisyyttä yritettiin vielä lisätä rikastamalla bakteerilaimennoksia. Rikastusmenetelmää kokeiltiin vain B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia sisältävän kantaliuoksen laimennoksilla. Laimennokset sentrifugoitiin ja pohjalle jäänyt bakteerimassa siirrettiin streptokokkeja suosivaan elatusaineputkeen (Todd-Hewitt). Elatusaineputkea kasvatettiin neljä tuntia lämpökaapissa, jonka jälkeen putkista tehtiin normaalia GBS PNA FISH –testi.

Bakteeriliuoksien rikastus vahvisti GBS PNA FISH –tekniikan tulosta huomattavasti. Kaikki viisi laimennosta fluoresoivat mikroskoipoitaessa täydellisesti ja vain bakteerisolujen määrässä näkyi eroa. (Ks. liite 7.)

9 TULOSTEN LUOTETTAVUUS

GBS PNA FISH –tekniikan spesifiteettiä tutkittiin useilla eri bakteerilajeilla, joiden aitous oli varmistettu aiemmin luotettavilla testeillä. Näille bakteerilajeille tehty GBS PNA FISH –testit tehtiin kuudessa eri sarjassa useina eri päivinä. Jokaisessa sarjassa oli edustettuina eri bakteerilajeja. Tulokset olivat kuitenkin samat päivästä ja lajeista riippumatta.

GBS PNA FISH -tekniikan sensitiviteettiä eri menetelmillä tutkittaessa, pyrittiin bakteerimäärä pitämään samana kaikissa tutkimukseen käytetyissä kantaliuoksissa. Laimennossarjoista tehtiin hajotusviljelmät verimaljoille ja maljojen kasvusta laskettiin bakteeripesäkkeet, jolloin saatiin bakteerin CFU-määrä (Colony Forming Unit). CFU-määrän avulla voitiin laskea arvioitu määrä siitä kuinka paljon alkuperäinen kantaliuos on sisältänyt tutkittavaa bakteeria. Jokaisessa kantaliuoksessa käytetty bakteerimäärä saatiin melko samaksi, joten eri menetelmillä tehtyjen sensitiviteettitutkimusten tulokset ovat keskenään vertailtavissa. (Taulukko 1.) (Ks. liite 8.)

TAULUKKO 1. Sensitiviteetin tutkimiseen käytettyjen kantaliuosten vahvuudet.

Sensitiviteettitutkimus	Sensitiviteetti: bakteeriseos	Sensitiviteetti: GBS	Sensitiviteetti: GBS, rikastus
Kantaliuoksen vahvuus	$7,2 \cdot 10^8$ CFU / ml	$8 \cdot 10^8$ CFU / ml	$9,1 \cdot 10^8$ CFU / ml

Sensitiviteettiä tutkittaessa alettiin myös epäillä toimiiko bakteerien kiinnitys objektilasille kunnolla. Tämä varmistettiin kokeilemalla eri kiinnitystapoja, joista parhain tulos saatiin tekniikalla, jossa käytettiin korkeinta lämpötilaa (+80 °C). Sensitiviteetti rikastusmenetelmällä on ainoa tutkimus, jossa bakteerit kiinnitettiin tällä korkeammalla lämpötilalla. +80 °C:n ja +55 °C:n kiinnitysten välillä oli eroja mikroskopoitaessa lähinnä siinä, että korkeammalla lämpötilalla kiinnitetyssä lasissa bakteerit olivat nättisti kiinni samassa tasossa lasia, kun taas matalammalla lämpötilalla kiinnitetyssä niitä saattoi seilata eri tasoissa. Fluoresenssi oli vain hiukan parempi +80 °C:n kiinnityksessä. Rikastusmenetelmän ja kahden muun sensitiviteettitutkimusmenetelmän tulosten välillä on kuitenkin niin suuri ero, että kiinnityslämpötila ei suinkaan ole ainoa vaikuttava tekijä siinä asiassa, vaan tekniikka ei todella pysty erottamaan oikeaa bakteeria, jos sitä ei ole todella suurta määrää tutkittavassa liuoksessa.

Mikroskopoitaessa objektilaseja, varsinkin spesifiteettiä tutkittaessa, ei-fluoresoivat lasit katsottiin myös valomikroskoopilla, joilloin voitiin varmistaa, että bakteeria varmasti löytyi lasilta. Näin saatiin varmistettua, että B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin fluoresointi oli todellista. Ja vaikka muut lajit eivät fluoresoineetkaan, saatiin tarkistuksella varmistettua, että niitä kuitenkin löytyi objektilasilta. Useimmat objektilaseista mikroskoipoitiin kahden henkilön toimesta, joten myös mikroskopoinnin luotettavuus pitäisi olla kunnossa.

10 POHDINTA

GBS PNA FISH –tekniikka toteutti odotukset sen spesifiteettiä eli tarkkuutta tutkittaessa. Tekniikan sensitiivisyyden eli herkkyuden paljastuessa lähes olemattomaksi, koko tekniikan käyttötarkoitus alkoi mietittyä. Jos tekniikka ei pysty tunnistamaan sille spesifistä bakteeria muiden bakteerien joukosta, pitää sen käyttötarkoitusta miettiä uudestaan. Ohjaajani Pentti Kuuselan suullisen tiedonannon mukaan myös Yhdysvalloissa parhaillaan tehtävä samantyyppinen tutkimus on ajautunut vastaavanlaisiin ongelmiin.

GBS PNA FISH –tekniikan tulosten tulkintakaan ei oikeassa tilanteessa olisi helppoa. Tutkimuksissamme käytössä olleet bakteeriliuokset olivat hyvin vahvoja eli ne sisälsivät paljon bakteeria, mutta silti joissain tapauksissa objektilasilta joutui pitkäänkin hakemaan paikkaa, jossa fluoresoivaa bakteeria oli tarpeeksi. Käytettävän tekniikan pitäisi olla varma. Muutamalla mikroskoopin näkökentän katsomisella pitäisi saada yleiskuva näytteestä. Tällä tekniikalla se ei kuitenkaan onnistuisi, sillä tekniikan herkkyys ei riitä käsittelemään aitoja potilasnäytteitä.

B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki aiheuttaa edelleenkin vakavia infektioita vastasyntyneillä. Edelleenkin bakteerin tunnistustapana käytetään viljelyä, jonka kesto on 24-48 tuntia. GBS PNA FISH –tekniikka ei valitettavasti tällä kertaa pystynyt nousemaan viljelyn rinnalle tehtäväksi päivystystutkimukseksi. Onneksi eri tekniikat kehittyvät jatkuvasti eteenpäin ja markkinoille on jo tullutkin lupaavan kuuloisia laitteita, joiden toimintaa ja tunnistustehokkuutta voidaan tutkia.

Yksi lupaavimmista tunnistusmenetelmistä on PCR-menetelmä, jolla tutkittava bakteeri voidaan tunnistaa muutamassa tunnissa. Laitteen käyttö on huomattavasti yksinkertaisempaa kuin esimerkiksi PNA FISH –tekniikan käyttö ja tekniikka on myös nopeampi. B-ryhmän beetahemolyyttinen bakteeri on yksi bakteereista, jolle tunnistukseen tarvittavat reagenssit on jo luotu, joten kenties PCR-menetelmä on tässäkin tapauksessa tulevaisuuden tunnistuslaite.

LÄHTEET

- Carlson, Petteri - Halmesmäki, Erja - Järvenpää, Anna-Liisa - Kostiala, Anja - Lyytikäinen, Outi - Nuorti, Pekka - Ranta, Tapio - Sarkkinen, Hannu - Uotila, Jukka - Vuento, Risto - Ämmälä, Martti 2002: Invasiiviset B-ryhmän streptokokki-infektiot Suomessa vuosina 1995-2000. Suomen Lääkärilehti 48 (2002).
- Carlson, Petteri - Halmesmäki, Erja - Järvenpää, Anna-Liisa - Kurkinen, Merja - Lyytikäinen, Outi - Nuorti, Pekka - Sarkkinen, Hannu - Uotila, Jukka - Vuento, Risto - Ämmälä, Martti 2006: Vastasyntyneiden GBS-taudin ehkäisy - asiantuntijaryhmän suositus. Suomen Lääkärilehti 46 (2006).
- Coull, James - Fiandaca, Mark - Hyldig-Nielsen, Jens J. - Stender, Henrik 2001: PNA for rapid microbiology. Journal of Microbiological Methods 48 (2002). 1-17.
- Coull, James - Hyldig-Nielsen, Jens J. - Oliveira, Kenneth - Perry-O'Keefe, Heather - Rigby, Susan - Stender, Henrik - Sørensen, Ditte 2001: Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. Journal of Microbiological Methods 47 (2001). 281-292.
- Heikkinen, Terho 2002: Vastasyntyneiden B-streptokokki-infektioiden ehkäisy. Duodecim. Verkkodokumentti. Päivitetty 2005. <http://www.terveysportti.fi/ltk/ltk.koti?p_haku=streptococcus%20agalactiae> Luettu 12.1.2007.
- Huovinen, Pentti - Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Martti - Vaheri, Antti - Valtonen, Ville 2003: Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Duodecim.
- Huovinen, Pentti - Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Martti - Vaheri, Antti - Valtonen, Ville 2003: Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja II. Helsinki: Duodecim.
- Kuusela, Pentti 2007. Dosentti. Helsinki. Suullinen tiedonanto 22.3.
- PNA-FISH: Nopea kandidemian ja bakteremian patogeenien identifiointi. 2005. PowerPoint-esitys. Oriola - Taure Virpi.

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 B-RYHMÄN BEETAHEMOLYYTTINEN STREPTOKOKKI	2
3 GBS-INFEKTIO	2
4 PNA FISH TEKNIikka	4
5 TUTKIMUSONGELMAT	5
6 MENETELMÄOHJE	6
6.1 Välineet	6
6.2 Työohje	7
6.3 Mikroskopointi	7
7 TYÖN SUORITUS	8
7.1 Bakterikannat	8
7.2 Spesifiteetti	8
7.3 Sensitiviteetti	9
7.4 Sensitiviteetti rikastusmenetelmällä	10
8 TULOKSET	10
8.1 Spesifiteetti	10
8.2 Sensitiviteetti	11
8.3 Sensitiviteetti rikastusmenetelmällä	11
9 TULOSTEN LUOTETTAVUUS	12
10 POHDINTA	14
LÄHTEET	15

LIITTEET 1-8

Streptococcus agalactiae (GBS) PNA FISH – TYÖOHJE (Oriola 2005.)

1. Fiksaatio objektilasille.

- Tarvikkeet:
 - lämpölevy
 - kertakäyttöpipettejä
 - steriiliä vettä
 - viljelysauvoja
 - AdvanDx Microscope Slides
 - AdvanDx Fixation Solution
 - 96 % etanoli

1. Pudota objektilasille yksi tippa steriiliä vettä.
2. Lisää viljelysauvalla maljalta 2-3 bakteeripesäkettä objektilasille.
3. Pudota yksi tippa fiksaatioainetta objektilasille. ÄLÄ SEKOITA!
4. Laita objektilasi avoimelle lämpölevylle +55-80 °C 20 minuutiksi.
5. Nosta objektilasi lämpölevyltä etanolikylpyyn 5 minuutiksi.
6. Nosta lasit etanolista objektilasialustalle ja ilmakeivaa ne.

2. Hybridisointi.

- Tarvikkeet:
 - AdvanDx GBS PNA
 - AdvanDx Coverslips
 - kuumalevy + kansi

1. Pudota yksi tippa Probe-liuosta objektilasille ja lisää peitinlasi.
2. Laita objektilasi kannelliselle kuumalevylle +55 °C 90 minuutiksi (\pm 5 minuuttia).

3. Pesuliuoksen teko. (Uusi pesuliuos joka kerta!)

- Tarvikkeet:

- AdvanDx 60x Wash Solution
- kannellinen värjäysastia
- kuumavesihaude

1. Sääda kuumavesihaude +55 °C.
2. Laimenna pesuliuos tislattuun veteen. Jokaista näytelasia kohden tarvitaan 15 ml valmistettua pesuliuosta.
3. Kaada pesuliuos värjäysastiaan ja laita astia lämpenemään kuumavesihauteeseen.

4. Pesu ja kiinnitys.

- Tarvikkeet:

- pesuliuos ja vesihaude

1. Nosta objektilasit kuumalevyiltä ja poista peitinlasi.
2. Upota lasit kuumavesihauteessa (+55 °C) olevaan pesuliuokseen 30 minuutiksi (± 5 minuuttia).

5. Tarkastelu.

- Tarvikkeet:

- AdvanDx Mounting Medium
- AdvanDx Coverslips
- fluoresenssimikroskooppi + FITC / Texas Red Dual Band –filteri

1. Ilmakuivaa objektilasit ja lisää Mounting Mediumia yksi tippa jokaiseen.
2. Lisää peitinlasi.
3. Mikroskopoi näytteet fluoresenssimikroskoopilla käyttäen FITC / Texas Red Dual Band –filteriä.

GBS PNA FISH – SPESIFITEETTI

Tekniikan spesifiteettiä eli tarkkuutta tutkitaan useilla eri bakteerikannoilla ja pyritään varmistamaan, että GBS PNA FISH –tekniikkaa tunnistaa varmasti kaikki oikeat B-ryhmän streptokokit.

Bakteerikannat:

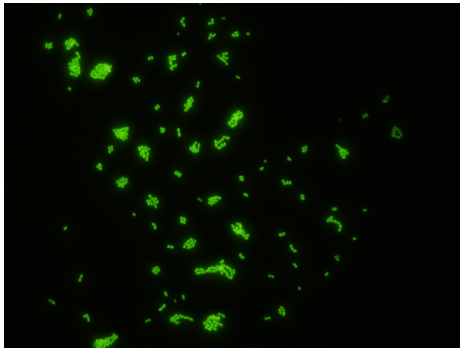
- B-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus agalactiae* (8 bakteerikantaa)
- A-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus pyogenes* (8 bakteerikantaa)
- G-ryhmän streptokokki eli *Streptococcus canis* (8 bakteerikantaa)
- *Enterococcus faecium* (8 bakteerikantaa)
- *Enterococcus faecalis* (8 bakteerikantaa)
- *Lactobacillus* sp. (4 bakteerikantaa)
- *Escherichia coli* (4 bakteerikantaa).

Bakteerikantoja on siis yhteensä 48 kappaletta. Jokaiselle bakteerikannalle tehdään GBS PNA FISH –testi ja arvioidaan onko tulos positiivinen vai negatiivinen.

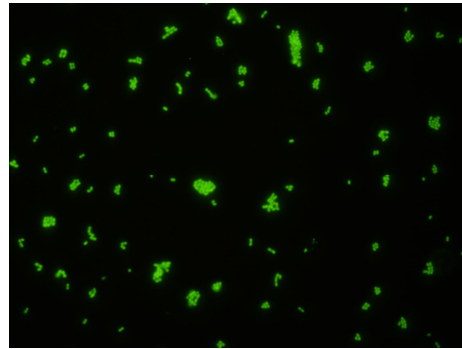
Streptococcus agalactiae antoi kaikilla kerroilla positiivisen tuloksen, joka oli selvästi erotettavissa vahvana fluoresointina objektilasia mikroskopoitaessa.

Kaikki muut bakteerilajit antoivat negatiivisen tuloksen. Muut bakteerilajit eivät fluoresoineet, mutta jonkinlaista fluoresoivaa ”utua” oli erotettavissa mikroskopoitaessa. Tämä ”utuinen”, todella vähäisesti fluoresoiva, massa ei kuitenkaan loista yhtään niin kirkkaasti kuin B-ryhmän streptokokkien kohdalla.

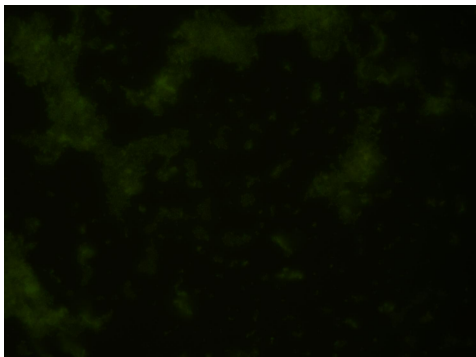
BAKTEERILAJIEN TUNNISTUSTULOKSET GBS PNA FISH -MENETELMÄLLÄ



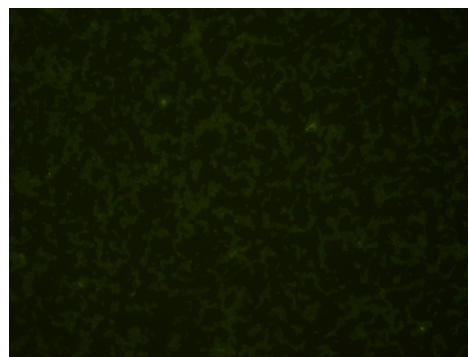
Streptococcus agalactiae



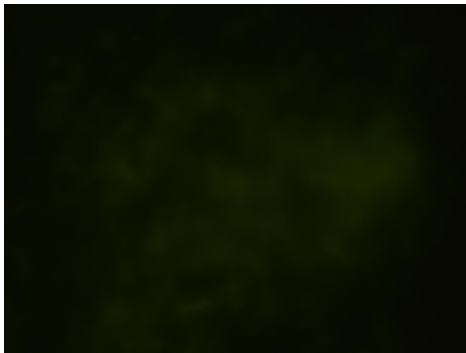
Streptococcus agalactiae



Streptococcus pyogenes



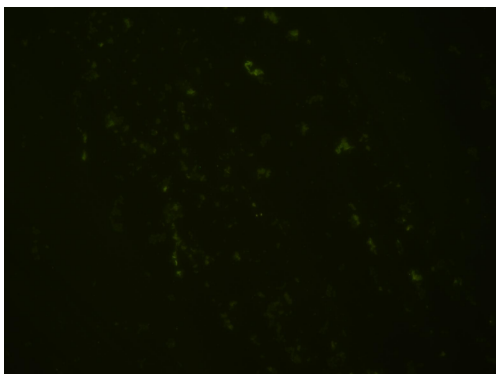
Streptococcus canis



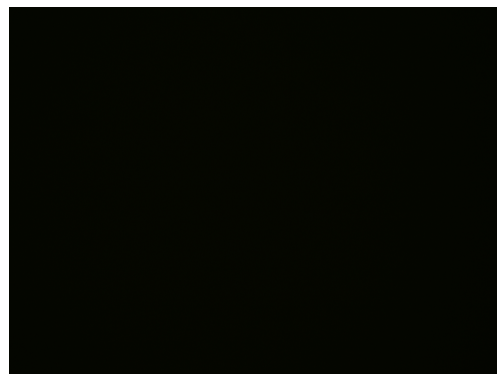
Lactobacillus sp.



Escherichia coli



Enterococcus faecium



Enterococcus faecalis

GBS PNA FISH – SENSITIVITEETTI

Tutkitaan GBS PNA FISH –tekniikan sensitiviteettiä eli herkkyyttä ja pyritään siis löytämään pienin mahdollinen B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin bakteerimäärä, jonka pystyy luotettavasti tunnistamaan positiiviseksi bakteeriseoksesta.

Bakteerikannat:

- *Streptococcus agalactiae* eli B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki
- *Escherichia coli*
- *Enterococcus faecalis*
- *Lactobacillus sp.*

B-ryhmän beetahemolyyttisestä streptokokista tehdään oma kantaliuos, kun taas kolme muuta bakteeria sekoitetaan yhdessä ”taustaliuokseksi”. Molempia liuoksia lisätään yhteen laimennossarjan mukaisesti.

Taustan kantaliuos: 2 ml NaCl + 2-3 pesäkettä kutakin bakteeria (ei *Streptococcus agalactiae*). Taustasta laimennokset sekä maljaus suklaamaljalle CFU:n laskemista varten.

Laimennokset (200 µl + 1,8 ml NaCl = 2 ml):

- | | |
|-------------|-------------------------------|
| 1. 1:10 | → käyttöön tuleva taustaliuos |
| 2. 1:100 | |
| 3. 1:1000 | → maljaus + lasku |
| 4. 1:10000 | → maljaus + lasku |
| 5. 1:100000 | → maljaus + lasku |

Streptococcus agalactiae:n kantaliuos: 1 ml NaCl + Mc Farland 1:n vahvuuden verran bakteeripesäkkeitä. Tehdään laimennossarja sekä maljaus verimaljalle CFU:n laskemista varten.

Laimennokset (100 µl + 900 µl NaCl = 1 ml):

- | | | |
|---------------|-------------------------------|-------------------|
| 1. 1:10 | → yhdistetään taustaliuokseen | |
| 2. 1:100 | → yhdistetään taustaliuokseen | |
| 3. 1:1000 | → yhdistetään taustaliuokseen | |
| 4. 1:10000 | → yhdistetään taustaliuokseen | → maljaus + lasku |
| 5. 1:100000 | → yhdistetään taustaliuokseen | → maljaus + lasku |
| 6. 1:1000000 | | → maljaus + lasku |
| 7. 1:10000000 | | → maljaus + lasku |

Yhdistetään molempien kantaliuosten laimennokset testisuspensioiksi seuraavalla tavalla:

1. GBS-suspensio 1:10, 200 µl + taustasuspensio 1:10, 200 µl.
2. GBS-suspensio 1:100, 200 µl + taustasuspensio 1:10, 200 µl.
3. GBS-suspensio 1:1000, 200 µl + taustasuspensio 1:10, 200 µl.
4. GBS-suspensio 1:10000, 200 µl + taustasuspensio 1:10, 200 µl.
5. GBS-suspensio 1:100000, 200 µl + taustasuspensio 1:10, 200 µl.

Tulokset:

1. + Mahdollista sanoa positiiviseksi.
2. –
3. –
4. –
5. –

GBS PNA FISH – SENSITIVITEETTI (B)

Tutkitaan GBS PNA FISH –tekniikan sensitiviteettiä eli herkkyyttä ja pyritään siis löytämään pienin mahdollinen B-ryhmän beetahemolyyttisen streptokokin bakteerimäärä, jonka pystyy luotettavasti tunnistamaan positiiviseksi. B-ryhmän beetahemolyyttisestä streptokokista tehdään oma kantaliuos, josta tehdään laimennossarja.

Bakteerikannat:

- *Streptococcus agalactiae* eli B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki.

Streptococcus agalactiae:n kantaliuos: 1 ml NaCl + Mc Farland 1:n vahvuuden verran bakteeripesäkkeitä. Tehdään laimennossarja sekä maljaus verimaljalle CFU:n laskemista varten.

Laimennokset (100 µl + 900 µl NaCl = 1 ml):

- | | | |
|---------------|----------------|-------------------|
| 1. 1:10 | → GBS PNA FISH | |
| 2. 1:100 | → GBS PNA FISH | |
| 3. 1:1000 | → GBS PNA FISH | |
| 4. 1:10000 | → GBS PNA FISH | → maljaus + lasku |
| 5. 1:100000 | → GBS PNA FISH | → maljaus + lasku |
| 6. 1:1000000 | | → maljaus + lasku |
| 7. 1:10000000 | | → maljaus + lasku |

Yritetään lisätä GBS PNA FISH –tekniikan herkkyyttä sentrifugoimalla bakteerit putken pohjalle, jotta mahdollisimman paljon bakteeria saataisiin objektilasille.

Putket sentrifugoidaan 10000 rpm 2 minuuttia.

Supernatantti poistetaan imulla.

Lisätään 50 µl PBS-liuosta ja sekoitetaan sakka pipetillä.

Pipetoidaan 50 µl jokaista laimennosta omille GBS PNA FISH –laseille.

Suoritetaan GBS PNA FISH.

Tulokset:

1. ++
2. +
3. –
4. –
5. -

GBS PNA FISH - FIKSAATIOKOEILU

Kokeillaan GBS PNA FISH –tekniikkaa eri kiinnitysmenetelmillä:

1. Ilmakuivaus ja liekitys (ollut minuutin +80 °C ennen liekitystä).
GBS PNA FISH tulos negatiivinen.
2. Kiinnitys +80 °C:een lämpölevyllä.
GBS PNA FISH tulos positiivinen +++.
3. Kiinnitys +55 °C:een lämpölevyllä.
GBS PNA FISH tulos positiivinen ++.

Bakteerikannat:

- *Streptococcus agalactiae* eli B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki.

Kantaliuos = siirrostettu pesäkkeitä 1 ml:aan NaCl ja tehty McFarland 1 –vahvuinen seos.

Laimennokset (100 µl + 900 µl NaCl = 1000 µl):

- | | | |
|---------------|-------------------|--------------|
| 1. 1:10 | → GBS PNA FISH | |
| 2. 1:100 | | |
| 3. 1:1000 | | |
| 4. 1:10000 | → maljaus + lasku | - |
| 5. 1:100000 | → maljaus + lasku | 65 pesäkettä |
| 6. 1:1000000 | → maljaus + lasku | 5 pesäkettä |
| 7. 1:10000000 | → maljaus + lasku | 1 pesäke |

GBS PNA FISH –laseille lisätty 50 µl laimennosta.

Tulokset:

1. -
2. +++
3. ++

RIKASTUS + GBS PNA FISH

Kokeillaan GBS PNA FISH –tekniikkaa rikastamalla B-ryhmän beetahemolyyttistä streptokokkia. Rikastusputkina käytetään Falcon-putkia, joihin laitetaan 5 ml TH (Todd Hewitt) –elatusainetta. Elatusaineeseen lisätään 1 ml bakteeriliuosta. Rikastuksen vaikutusta GBS PNA FISH –tekniikan fluoresointiin tutkitaan kantaliuoksen eri laimennoksilla.

Bakteerikannat:

- *Streptococcus agalactiae* eli B-ryhmän beetahemolyyttinen streptokokki.

Kantaliuos = siirrostettu pesäkkeitä 1 ml:aan NaCl ja tehty McFarland 1 –vahvuinen seos.

Laimennokset (100 µl + 900 µl NaCl = 1000 µl):

- | | | |
|---------------|---------------------------|-------------------|
| 1. 1:10 | → rikastus + GBS PNA FISH | |
| 2. 1:100 | → rikastus + GBS PNA FISH | |
| 3. 1:1000 | → rikastus + GBS PNA FISH | |
| 4. 1:10000 | → rikastus + GBS PNA FISH | → maljaus + lasku |
| 5. 1:100000 | → rikastus + GBS PNA FISH | → maljaus + lasku |
| 6. 1:1000000 | | → maljaus + lasku |
| 7. 1:10000000 | | → maljaus + lasku |

Kantaliuoksesta tehdään laimennossarja yllä olevan taulukon mukaisesti.

Laimennossarjaa jatketaan, jotta maljauksessa saadaan laskettua pesäkkeiden lukumäärä.

Rikastus TH-elatusaineessa CO-lämpökaapissa +35 °C:ssa 4 tuntia.

Rikastuksen jälkeen putket sentrifugoidaan 3000 rpm 15 minuuttia.

Supernatantti poistetaan imulla.

Lisätään 50 µl PBS-liuosta ja sekoitetaan sakka pipetillä.

Pipetoidaan 50 µl jokaista laimennosta omille GBS PNA FISH –laseille.

Suoritetaan GBS PNA FISH. (HUOM! Kiinnitys lämpölevyllä +80 °C.)

Tulokset:

1. Aivan liikaa bakteeria. Loistaa +++, mutta soluja ei voi erottaa, on vain massaa.
2. Melko liikaa bakteeria. Puolet kiinnittyneet, puolet leijuvat. Loistaa +++.
3. Ensimmäinen erinomainen. Loistaa +++, solut kiinnittyneet hyvin.
4. Loistaa +++, solut kiinnittyneet hyvin. Soluja hiukan vähemmän kuin 3:ssa.
5. Soluja harvakseltaan, mutta tulos on silti selkeä positiivinen, kiinnittyneet hyvin.

TULOSTEN YHTEENVETO

RIKASTUS (*Streptococcus agalactiae*)

GBS PNA FISH (kiinnitys +80°C)

1. +++ 1:10
2. +++ 1:100
3. +++ 1:1000
4. +++ 1:10000
5. +++ 1: 100000 (91 pesäkettä) $91 \cdot 10^5$ CFU / 10 μ l = **$91 \cdot 10^7$ CFU / ml = $9,1 \cdot 10^8$ CFU / ml** (=bakteerimäärä kantaliuoksessa)

SENSITIVITEETTI (*Streptococcus agalactiae*, ei rikastusta)

GBS PNA FISH (kiinnitys +55°C)

1. ++ 1:10
2. + 1:100
3. - 1:1000
4. - 1:10000
5. - 1: 100000 (80 pesäkettä) $80 \cdot 10^5$ CFU / 10 μ l = **$80 \cdot 10^7$ CFU / ml = $8 \cdot 10^8$ CFU / ml** (=bakteerimäärä kantaliuoksessa)

SENSITIVITEETTI (*Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Lactobacillus* sp., ei rikastusta)

GBS PNA FISH (kiinnitys +55°C)

1. + 1:10
2. - 1:100
3. - 1:1000
4. - 1:10000 (*E. coli* 38 pesäkettä, *E. faecalis* 7 pesäkettä, *Lactobacillus* sp. 0 pesäkettä)
5. - 1: 100000 (B: 72 pesäkettä) $72 \cdot 10^5$ CFU / 10 μ l = **$72 \cdot 10^7$ CFU / ml = $7,2 \cdot 10^8$ CFU / ml** (=B:n bakteerimäärä kantaliuoksessa)
(*E. coli* $4 \cdot 10^5$ CFU / 10 μ l = **$4 \cdot 10^7$ CFU / ml** (= *E. coli* –bakteerimäärä kantaliuoksessa)
(*E. faecalis* $1 \cdot 10^5$ CFU / 10 μ l = **$1 \cdot 10^7$ CFU / ml** (= *E. faecalis* –bakteerimäärä kantaliuoksessa)

(CFU = Colony Forming Unit = bakteereita sisältävien partikkelien määrä (pesäkkeen muodostava yksikkö).)